

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09140

研究課題名(和文) 肺高血圧症および肺虚血再灌流障害における新しい細胞治療

研究課題名(英文) Novel cell therapy for pulmonary hypertension and pulmonary ischemia-reperfusion injury

研究代表者

松尾 諭志 (MATSUO, Satoshi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10869655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：既報に従い肺高血圧モデルラットの作成を行った。モノクロタリンをラットの頸部に皮下注射し3週間後に肺高血圧が発症することを確認した。その後、心臓カテーテル検査を行い、右室収縮期圧を測定した。右室収縮期圧の上昇が得られ、肺高血圧を確認した。さらに、モノクロタリンによる肺高血圧モデルラットに肺動脈遮断を行うことで、肺高血圧モデルにおいて虚血再灌流障害を加えた新たな動物モデル作成を試みた。本研究では幹細胞による治療効果の確認、及び機序解明のために長期生存が必要である。そのため、肺高血圧を維持しつつ、長期生存可能な動物モデル作成を試みた。モノクロタリン投与量を調整し、動物モデルとしての最適化を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで肺高血圧動物モデルに対する骨髄間葉系幹細胞移植の研究は報告されているが、これらの報告は血管内皮細胞の抗アポトーシス効果や血管平滑筋の異常増殖制御が主な治療機序とされており、投与細胞が血管内皮細胞に分化し、肺高血圧を改善させる治療機序の報告はない。また、肺高血圧下の肺に対する虚血再灌流障害の予防を髄間葉系幹細胞移植にて検討した研究もない。そのため、本研究でMuse細胞の効果が証明されれば、腫瘍化のない幹細胞移植が肺高血圧治療および虚血再灌流障害の予防に対して、今後臨床応用されるきっかけとなる研究と確信している。

研究成果の概要(英文)：We established a rat model of pulmonary hypertension following a previously described method. Subcutaneous injection of monocrotaline into the rat's neck induced pulmonary hypertension after a 3-week period. Cardiac catheterization was subsequently performed to measure right ventricular systolic pressure, confirming an increase in pressure and the presence of pulmonary hypertension.

To further enhance our understanding of pulmonary hypertension, we aimed to create a novel rat model by inducing ischemia-reperfusion injury through pulmonary artery clamping in the existing monocrotaline-induced pulmonary hypertension model. The development of a long-term survival animal model is crucial to verify the therapeutic efficacy of stem cells and elucidate the underlying treatment mechanisms. Therefore, our objective was to establish an animal model capable of maintaining pulmonary hypertension for an extended duration. We optimized the monocrotaline dosage to refine the animal model accordingly.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：肺高血圧 肺虚血再灌流障害 再生医療

1. 研究開始当初の背景

後天性および先天性心疾患に伴う肺高血圧症の合併は、開心術のリスクを高める重要な因子である。術前からの肺高血圧症において高ストレス下に晒された血管内皮細胞の障害が遷延することに加え、開心術に伴う肺虚血再灌流障害により血管内皮機能はさらに障害を受け、酸素化能の低下と右心負荷による循環不全を惹起する。しかし、肺高血圧症合併症例に対する虚血再灌流障害の積極的予防策は、臨床上これまで講じられていない。そこで障害組織に遊走・生着する Muse 細胞 (Multilineage -differentiating stress enduring cells) を治療に用いることを想起した。Muse 細胞は自発分化能を持つ幹細胞であり、これまでに血管内皮細胞や血管平滑筋細胞への自発分化を確認している。本研究では肺高血圧症に伴う肺虚血再灌流障害に対する Muse 細胞の抗炎症作用効果と内皮・血管平滑筋再生による肺血管床の保護について検証を行う。

2. 研究の目的

Muse 細胞はヒト生体内に内在する新たな間葉系幹細胞として、2010 年に東北大学にて発見された。Muse 細胞は自己複製能、三胚葉性の分化能などを有する。以下の特性は本研究において治療機序に大きく寄与すると期待される。

- (1)自発分化能：Muse 細胞は障害組織へ遊走・生着し、自発的に組織特異的な細胞へと分化し組織修復と機能回復をもたらす。また、我々のこれまでの研究で、in vitro および in vivo において Muse 細胞が大動脈の血管内皮細胞に分化することが確認されている。
- (2)ストレス耐性：in vitro および in vivo 実験で立証されている。
- (3)抗炎症作用：急性炎症モデルで確認されている。
- (4)分化能の多様性：Muse 細胞は血管内皮細胞のみならず血管平滑筋細胞にも自発分化する。すなわち、本来の血管組織構成に近い形で血管壁修復が可能となることを示唆している。

以上のユニークな特性により、Muse 細胞による治療が、肺高血圧治療に対する従来の肺血管拡張薬による治療と、肺虚血再灌流障害に対する対症療法を超える新たな積極的治療法として期待できると考えた。障害を受け変性した肺血管を本来の自己組織に近い組織修復を可能とすることを目指す研究であり、これは従来の治療戦略追求とは一線を画すものである。

3. 研究の方法

(1) 肺高血圧モデル作製：

既報によれば、肺高血圧ラットモデルは長期生存が得られない。ここに、さらに肺虚血再灌流障害というストレスを加えるとラットの生存率がより低下することが予想される。そこで、まずは肺高血圧モデルラットの確立を目指した。

一般的にはモノクロタリン 60mg/kg によるモデルが一般的であるが、長期生存を得られ、肺高血圧を維持できるモデルを得るために、モノクロタリン投与量の最適化を図った。50 mg/kg、40 mg/kg、30 mg/kg、20 mg/kg、10 mg/kg のモノクロタリン投与量によって 5 群とする。心臓カテーテル検査による右室圧、肺動脈圧測定、肺組織学的評価、及びラットの生存日数から、モノクロタリン投与量を最適化する。

(2) 肺高血圧における肺虚血再灌流障害モデル作製

前項で検討したモノクロタリンの投与量により肺高血圧モデルラットを作成する。その後、左第五肋間開胸を行い、マイクロクリップで左肺動脈を 1 時間遮断する。遮断解除後、閉胸しケージに戻す。術後三日目に右室圧を測定し、肺組織学的評価を行う。

(3) Muse 細胞の収集

ヒト骨髄間葉系細胞を継代し、Fluorescence-activated cell sorting (FACS), Magnetic cell sorting (MACS) を用いて Muse 細胞を収集する。

(4) 細胞投与実験

最適化した肺高血圧モデルラットに肺虚血再灌流障害を生じさせる。最適化した投与時期に Muse 細胞、間葉系幹細胞、PBS をそれぞれ投与し、治療効果判定を行う。

(5) 評価

細胞投与 3 日目、5 日目を行う。項目は下記の内容を行う。

心臓カテーテル検査：右室圧、肺動脈圧収縮期圧を測定する。Muse 細胞による肺高

血圧抑制効果を評価する。

血液ガス分析：肺酸素化能を評価する。

肺乾湿重量比 (W/D ratio) 検査

Western Blot : Bcl-2、Akt、IL-6、eNOS

組織学的評価： HE 染色、EM 染色、TUNEL 染色

4 . 研究成果

まず、既報に従い肺高血圧モデルラットの作成を行い、肺高血圧モデルが作成できているかの確認を行った。60mg/kg のモノクロタリンをラットの頸部に皮下注射し3週間後に肺高血圧が発症することを確認した。全身麻酔、人工呼吸器下に右内頸静脈からポリエチレンチューブを右室まで挿入し、右室収縮期圧を測定した。モノクロタリン非投与ラットに比べ右室収縮期圧の上昇が得られ、肺高血圧モデルが作成できていることを確認した。

さらに、モノクロタリンによる肺高血圧モデルラットに肺動脈遮断を行うことで、肺高血圧モデルにおいて虚血再灌流障害を加えた新たな動物モデル作成を試みた。既報では短期間の評価しか行っていないが、本研究では幹細胞による治療効果の確認、及びその機序を解明するために長期生存が必要である。そのため、肺高血圧を維持しつつ、長期生存可能な動物モデル作成を試みた。モノクロタリン投与量を調整し、動物モデルとしての最適化を図った。

Muse 細胞の培養、単離に関しては、既報に則り習得した。Muse 細胞は市販ヒト骨髄間葉系細胞 (MSC; mesenchymal stem cell; Lonza 社) をウシ胎児血清を含む培地で培養し、FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて SSEA-3 陽性細胞を sorting して単離した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	正木 直樹 (Masaki Naoki) (00837403)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	鈴木 佑輔 (Suzuki Yusuke) (70791698)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	細山 勝寛 (Hosoyama Katsuhiko) (70837046)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関